



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 23 747 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 198 23 747.2
⑳ Anmeldetag: 27. 5. 98
㉓ Offenlegungstag: 2. 12. 99

⑤① Int. Cl.⁶:
C 07 C 59/125
C 07 C 59/215
C 07 K 1/04
C 07 D 303/20
C 07 D 301/00
C 07 C 65/21
C 07 C 65/40
C 07 C 225/02
C 07 C 217/02
C 07 B 61/00
C 08 G 65/32
C 08 G 85/00

DE 198 23 747 A 1

// C07F 7/18, C07B 51/00

⑦① Anmelder:
Novartis AG, Basel, CH

⑦④ Vertreter:
Spott Weinmiller & Partner, 80336 München

⑦② Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

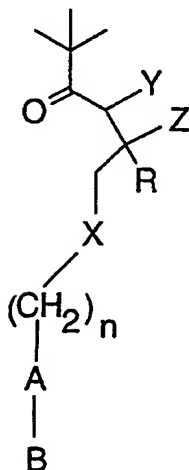
⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:
DE 37 38 567 A1
US 57 67 288

CAPLUS Abstracts:
1997:738515;
1997:218627;
1996:288889;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Photolabile Linker
⑤⑦ Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

an ein Harz gebundener Form und ihre Verwendung für
die Festphasensynthese und kombinatorische Chemie.



Formel (I)

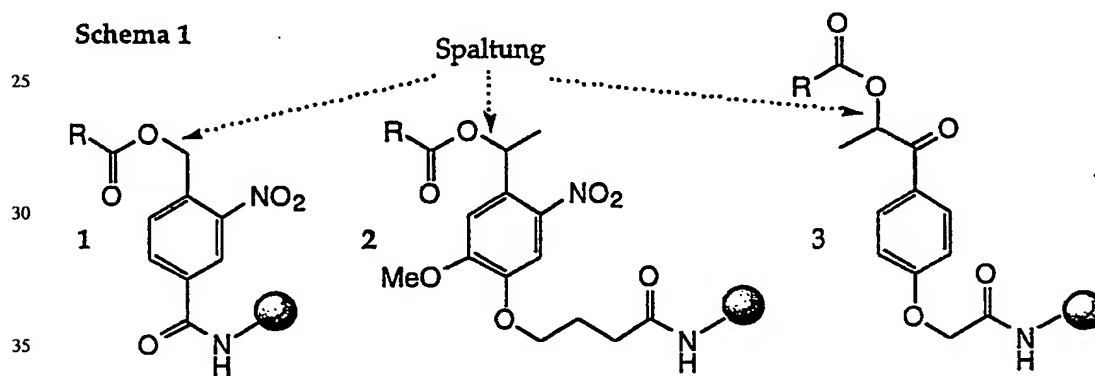
worin bedeuten
A CH₂ Phenylen
B COOH, CH₂OH, CH₂NH₂
R Wasserstoff, (C₁-C₆)-Alkyl
X Sauerstoff, CH₂
Y, Z jeweils OH oder zusammen einen Oxiranring
n null, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6
sowohl in freier als auch über die funktionelle Gruppe B

DE 198 23 747 A 1

Das rasch wachsende Gebiet der kombinatorischen Chemie hat das Interesse an organischen Synthesetechniken für die Chemie an fester Phase erneuert. Neben der Notwendigkeit Synthesemethoden zu entwickeln, die für den Aufbau organischer Moleküle an fester Phase geeignet sind, besteht ein Bedarf an verbesserten und neuartigen Linkern für die Verknüpfung der Moleküle an die Trägerphase.

Zusätzlich zu Linkern, die durch chemische Reagenzien (säure-, basen-, oder übergangsmetalllabile Linker) abgespalten werden können, kommt Linkern, die durch UV-Licht gespalten werden können, besonderes Interesse zu. Photolabile Linker bieten eine Reihe von Vorteilen gegenüber herkömmlichen Linkern: Die photolytische Spaltung stellt eine milde Methode dar, sie ist orthogonal zu anderen Reaktionsbedingungen und erlaubt damit mehr Flexibilität in der Syntheseplanung an fester Phase. Die Freisetzung der Moleküle kann erfolgen nachdem alle Schutzgruppen entfernt und das Harz gewaschen wurde. Somit können Moleküle für biologische Tests freigesetzt werden, ohne durch die Spaltungsreagentien verunreinigt zu sein. Ein weiterer Vorteil ist, daß durch die Belichtungszeit die Menge an abgespaltenen Molekülen sehr gut eingestellt werden kann. Photolabile Linker eignen sich ebenfalls für die Befestigung von tags, charakteristischen Substanzen, die das an das Harzkügelchen gebundene Molekül kodieren. Sie können dann unabhängig vom Molekül, das mit einem chemisch-spaltbaren Linker an das Harzkügelchen gebunden ist, zur Dekodierung abgespalten werden.

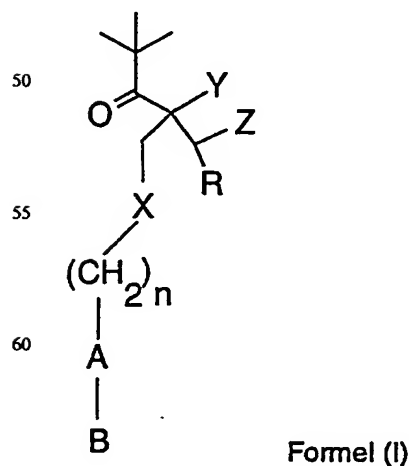
In der Literatur finden sich mehrere Beispiele für photolabile Linker (Schema 1). Den häufigsten Typ stellen o-Nitrobenzylverbindungen dar, die bereits seit 25 Jahren Verwendung finden (D. H. Rich; S. K. J. Gurwara, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1973,610). Der ursprünglich verwendete Linker 1 wurde weiter entwickelt und ist zur Zeit in der Form 2 kommerziell erhältlich.



Einige der mit 1 verbundenen Nachteile, wie lange Photolysezeiten, die Bildung eines reaktiven Nitrosoaldehyds als Photoprodukt, der mit freigesetzten Molekülen reagieren kann oder als innerer Lichtfilter wirkt, konnten mit der Entwicklung von 2 verringert werden. Daneben finden in begrenzten Umfang Phenacyl-Linker Verwendung, die zuerst von Wang (S. W. Wang, J. Org. Chem. 1976,41,3258) beschrieben wurden und später zu den p-Alkoxyphenacyl-Linkern 3 weiter entwickelt wurden (D. Bellof, M. Mutter, Chimia 1985, 39, 317). Ihr Nachteil liegt in längeren Bestrahlungszeiten und der reaktiven benzylichen Carbonylgruppe begründet.

Es bestand deshalb die Aufgabe, neue Linker bereitzustellen, die die bekannten Nachteile nicht aufweisen und einfach und schnell abspaltbar sind, wobei die Abspaltungsprodukte einfach aus dem Reaktionsgemisch entfernenbar sein sollten.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



worin bedeuten

A CH₂, Phenylen

B COOH, CH₂OH, CH₂NH₂

R Wasserstoff, (C₁-C₆)-Alkyl

X Sauerstoff, CH₂

Y, Z jeweils OH oder zusammen einen Oxiranring

n null, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6

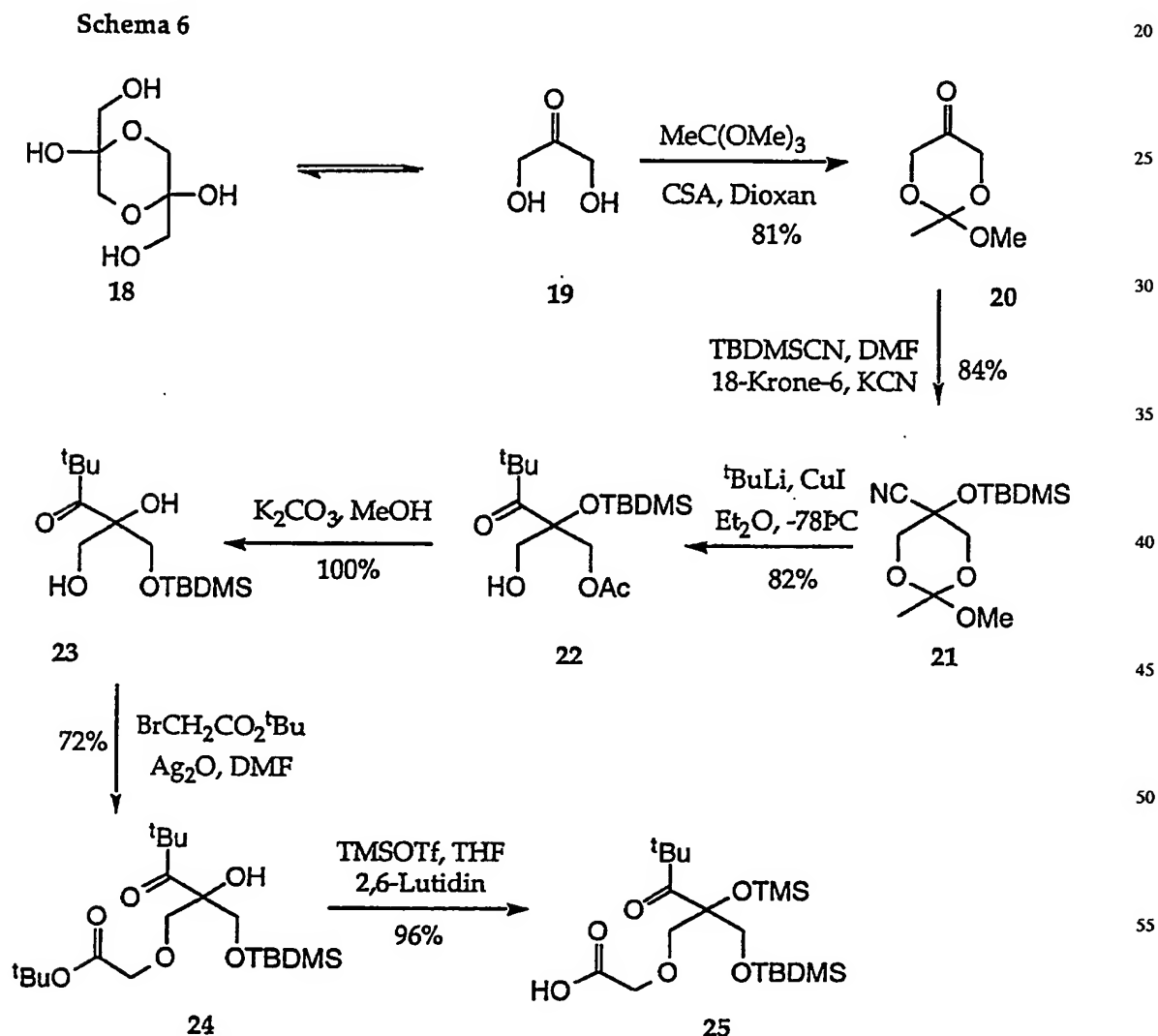
Diese Linker zeichnen sich durch gute chemische Stabilität (gegenüber Säuren und Basen), günstige Abspaltungs-kinetik und sehr verträgliche Photoprodukte (CO, Isobuten und harzgebundenes Aceton) aus.

Interessant sind insbesondere die Verbindungen der Formel (I) worin A gleich CH₂, R gleich Wasserstoff oder Methyl und n gleich Null ist. Besonders geeignet ist auch die Carboxylfunktion als Linker-Harz-Bindungsstelle.

Gegenstand der Anmeldung sind auch Verbindungen der Formel (I), die über die funktionelle Gruppe B an ein Harz gebunden sind.

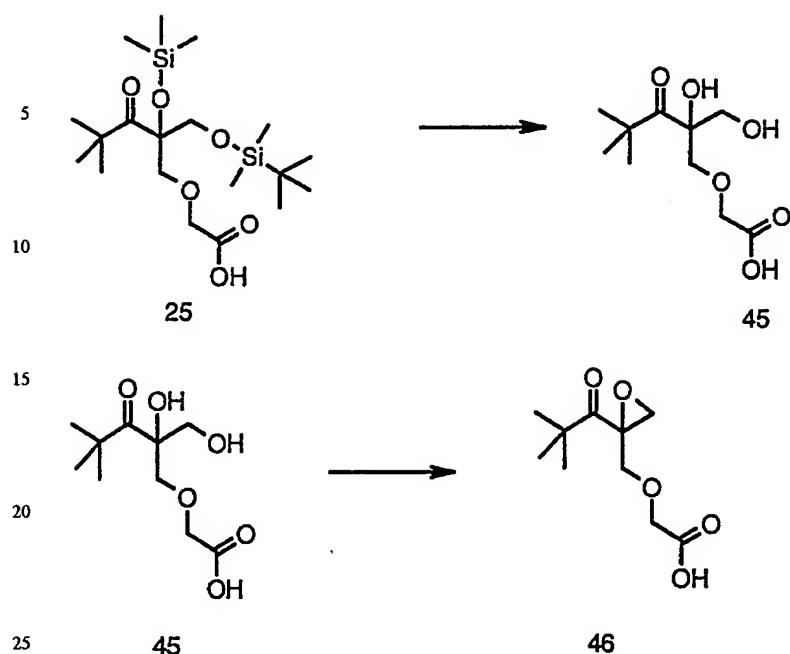
Geeignet als Harz sind prinzipiell alle Harze, die für die Festphasensynthese Verwendung finden, insbesondere Copolymerisationsharze wie z. B. Polystyrol-Harze mit 1% Divinylbenzol, Polyethylenglykol (PEG)-Polystyrol-Harze (z. B. Tentagel®), PEGA-Harze (mit Bis-2-acrylamidprop-1-yl polyethylenglycol quervernetztes Dimethylacrylamid und Mono-2-acrylamidprop-1-yl[2-aminoprop-1-yl]ethylenglykol), SynPhase Crowns (Polyethylenkörper mit aminofunktionalisiertem Polystyrol oder Methacrylsäure/Dimethacrylamid-Copolymer oder Polyhydroxyethylmethacrylsäure), sowie auch lösliche Harze, z. B. funktionalisiertes Polyethylenglykol der molekularen Masse 3000-20000 Dalton.

Die Synthese der Verbindungen der Formel (I) mit Y=Z gleich OH kann beispielsweise nach dem in Schema 6 dargestellten Reaktionsweg erfolgen:



Der photolabile Linker 25 kann mit dieser Synthesesequenz in Multigramm-Mengen in ca. 40% Gesamtausbeute ausgehend von Dihydroxyacetone (18) dargestellt werden.

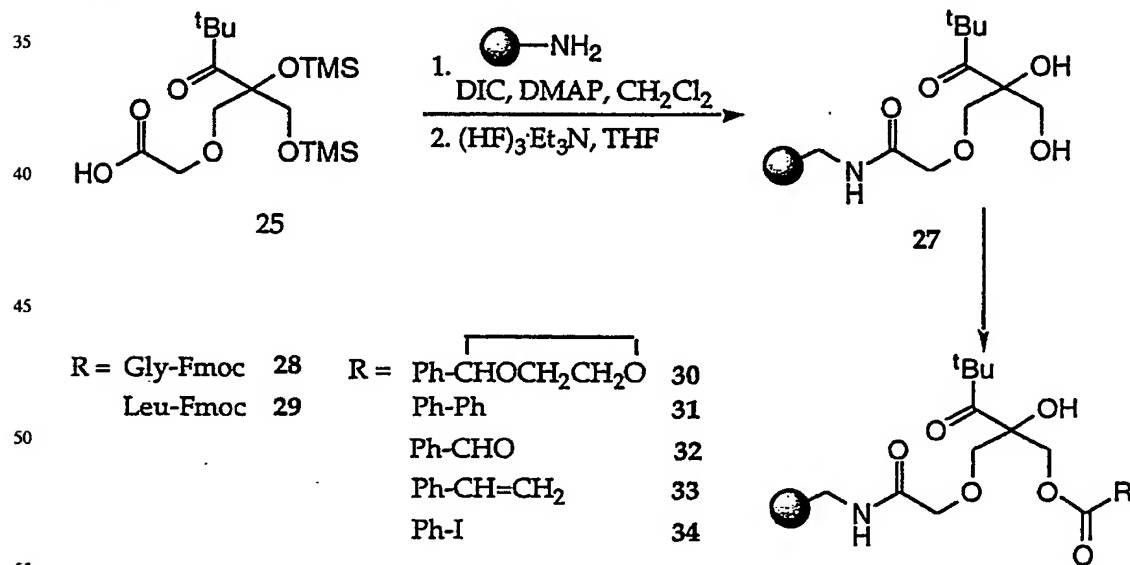
Abspaltung der Silylschutzgruppen aus 25 ist z. B. mit $(\text{HF})_3\text{Et}_3\text{N}$ möglich, aus den so erhaltenen Diolen oder den an der Festphase verankerten Diolen 27 kann mit Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester/2,6-Lutidin die entsprechend zweifach trimethylsilylgeschützte Verbindung und hieraus mit Citronensäure die Verbindung mit tertiärer O-Trimethylsilylgruppierung und freier primärer Hydroxygruppe erhalten werden. Die Oxirane der allgemeinen Formel (I) mit Y und Z gleich Oxiranring können aus Verbindung 25 z. B. mit folgender Synthesesequenz dargestellt werden:



Verankerung des Linkers am Harz und Beladung mit Säuren

Die Verankerung des Linkers 25 an kommerziell erhältliches aminoderivatisiertes Harz (TentaGel S NH₂) erfolgt mit vollständigem Umsatz.

Schema 7



Die Abspaltung der beiden Silylgruppen am Linker kann mit Fluorwasserstoff-Triethylamin-Reagenz an der Festphase (Schema 7) erfolgen.

Die Beladung mit Fmoc-Aminosäuren erfolgt nach der Methode der symmetrischen Anhydride. Die Beladung kann UV-spektroskopisch über die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe bestimmt werden. Sie beträgt typischerweise 60%-70% bezogen auf die ursprüngliche Beladung des Harzes mit Aminogruppen. Aromatische Carbonsäuren werden vorteilhaft über die Aktivierung mit Carbodiimid/DMAP mit dem Linker verknüpft.

Abspaltung der Säuren vom Harz

Als besonders geeignet für die photolytische Abspaltung der Säuren vom Linker erweist sich THF, aber auch Methylenchlorid und Dioxan stellen geeignete Lösungsmittel dar. Für wasserlösliche Säuren (Peptide, Oligonucleotide) ist eine Abspaltung auch in wässrigen Suspensionen möglich.

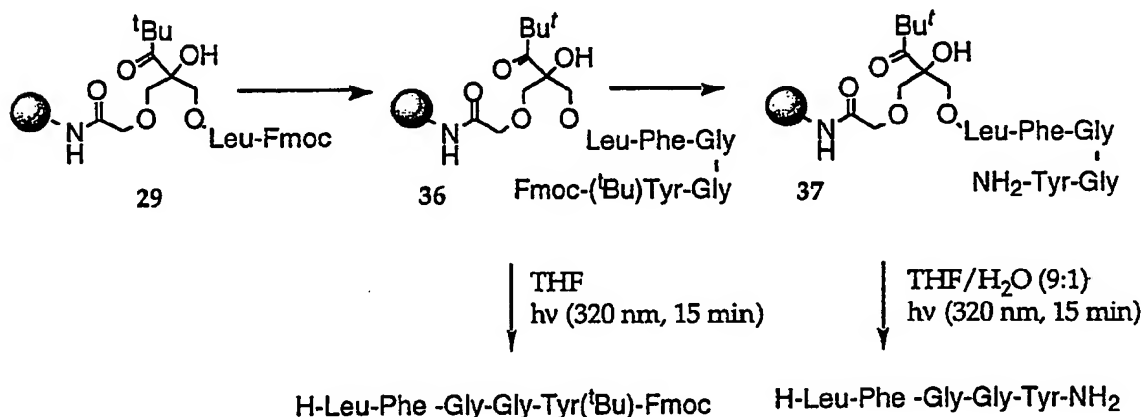
Die Geschwindigkeit der Photoabspaltung hängt stark von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts ab. Mit Licht >335 nm erfolgt die Abspaltung mit einer Halbwertszeit $T_{1/2}$ 25 min. mit Licht > 320 nm beträgt $T_{1/2}$ ca. 2 min. mit Licht > 305 nm nimmt $T_{1/2}$ auf ca. 0.5 min ab.

Ein Vergleich eines Pivaloyl-Linker-Harzes mit einem o-Nitrobenzyl-Linker-Harz unter identischen Bedingungen ergibt folgendes Ergebnis: Bestrahlung mit der 500 W-Hg-Lampe ($h\nu > 320$ nm) ergibt eine viermal schnellere Abspaltung der Biphenylcarbonsäure beim Pivaloyl-Linker als beim o-Nitrobenzyl-Linker.

Gegenstand der Anmeldung ist auch die Verwendung der erfindungsgemässen Verbindungen für die Festphasen- und kombinatorische Chemie, die hervorragende Eignung der Verbindungen für diese Zwecke wird durch die folgenden Beispiele belegt.

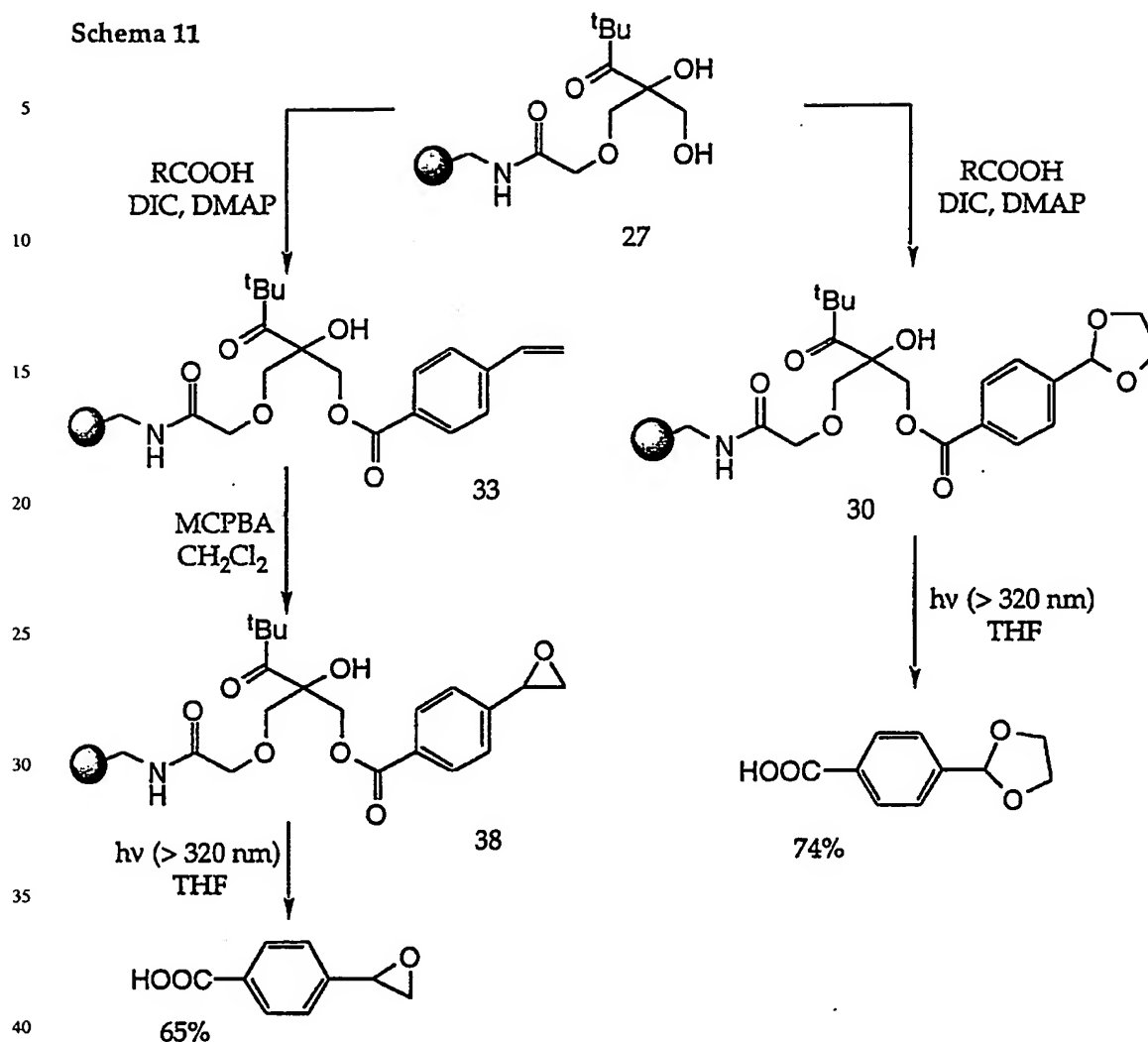
Synthese des Neuropeptids Leu-Enkephalin ($\text{H-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr-NH}_2$) nach der Fmoc-Methodik (Schema 10). Die Verwendung eines photolabilen Linkers ermöglicht wahlweise die Abspaltung des geschützten oder entschützten Peptids. Im Fall des festphasengebundenen geschützten Peptids findet Abspaltung von $\text{H-Leu-Phe-Gly-Gly-Tyr}^t\text{Bu-Fmoc}$ nach 15 min Bestrahlung in THF mit 86% Reinheit (88% Ausbeute) statt.

Schema 10



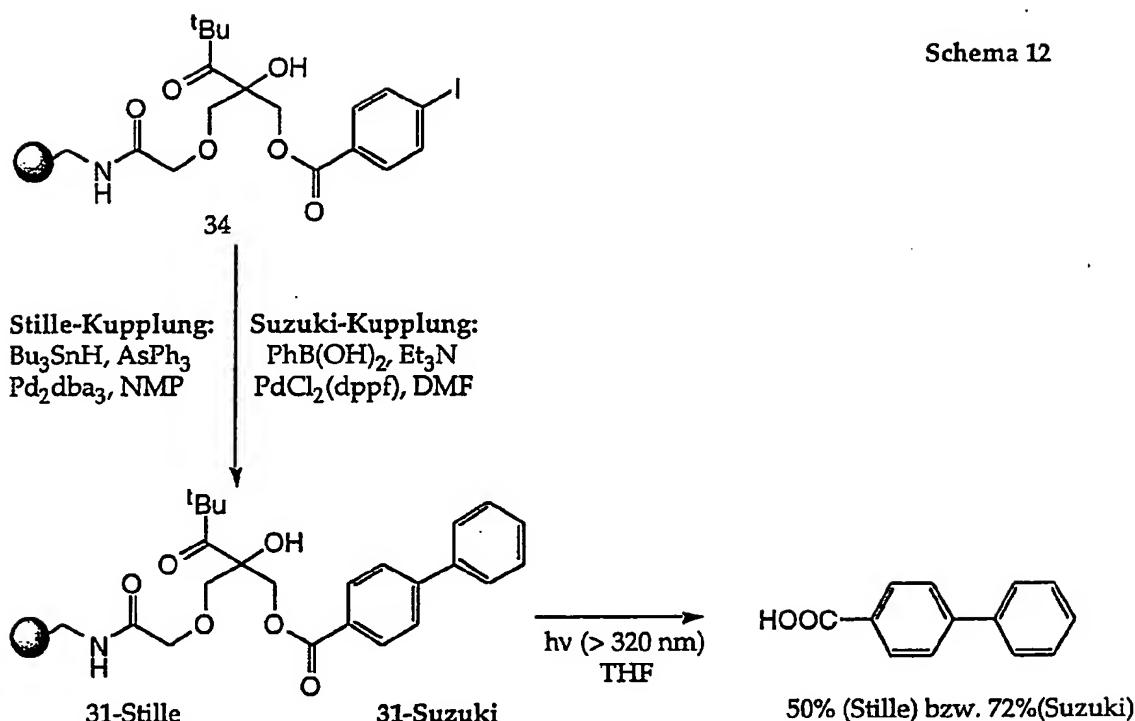
Die Abspaltung säure- und basenlabiler Substrate von der Festphase kann problematisch sein, da ein Großteil der Linker durch starke Säuren oder Basen gespalten wird. Wegen der sehr milden Bedingungen kann ein erfindungsgemässer photolabiler Linker für die Abspaltung dieser Verbindungen Verwendung finden, Schema 11 zeigt dies für Acetale bzw. Epoxide. Das Epoxid 38 wird dabei direkt an der Festphase durch Epoxidierung der linker-gebundenen 4-Vinylbenzoesäure 33 erzeugt. Photolyse unter Standardbedingungen ($h\nu > 320$ nm, 15 min, 25°C, THF) ergibt 4-(1,3-Dioxolan-2-yl)-benzoesäure (74% Ausbeute über 4 Schritte, 95% Reinheit) bzw. 4-Oxiranylbenzoesäure (65% Ausbeute nach 5 Schritten, 85% Reinheit).

Schema 11



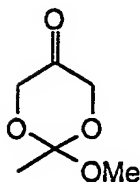
Eine wichtige Gruppe von Synthesemethoden auch in der Festphasenchemie stellen Palladium-katalysierte Reaktionen dar. Die Verwendung von Pd-Katalysatoren in der Festphasenchemie führt zu einer kräftigen Dunkelfärbung des Harzes, die auch durch intensives Waschen nicht beseitigt werden kann und möglicherweise eine photolytische Abspaltung erschwert. Schema 12 zeigt die Eignung der erfindungsgemässen Linker anhand einer Stille-Kupplung mit Tributylstannan und einer Suzuki-Kupplung mit Phenylboronsäure, jeweils mit linkergebundener Iodbenzoesäure (34). Es ist offensichtlich, dass der erfindungsgemässe Linker mit den Reaktionsbedingungen der beiden Palladiumreaktionen kompatibel ist. Auch führt die Dunkelfärbung des Harzes durch die Palladiumreagenzien zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Photoabspaltung.

Schema 12



Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne sie jedoch hierauf zu beschränken.

2-Methoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-on (20)



Dimeres Dihydroxyaceton (18) (4.04 g, 22.4 mmol, 1 equiv) und Campher-10-sulfonsäure (52 mg, 0.22 mmol, 0.01 equiv) werden in abs. Dioxan (200 ml) unter Argon auf 60°C erwärmt. 10 min nach vollständigem Lösen des Dimers wird Trimethyloorthoacetat (60 ml, 57.0 g, 474 mmol, 10 equiv) zugegeben. Die Lösung wird über Nacht bei 60°C gerührt, am Vakuum auf 20 ml eingengt und der Rückstand im Kugelrohrföfen (bei 140°C und 20 mbar) destilliert. Der Orthoester 20 (5.31 g, 36.3 mmol, 81%) wurde als klare, farblose Flüssigkeit erhalten.

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ (146.15)

berechnet: C 49.31%; H 6.90%;

gefunden: C 49.13%; H 7.07%.

MS (EI):

146 (0.1, M^+); 131 (2); 115 (24, $\text{M}^+ - \text{OMe}$); 43 (100); 88 (7).

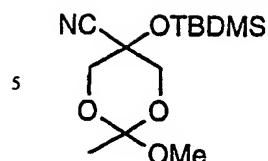
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta = 4.34$ (2H, d, $J = 17.9 \text{ Hz}$, CH_aH_b); 4.18 (2H, d, $J = 17.9 \text{ Hz}$, CH_aH_b); 3.39 (3H, s, OMe); 1.59 (3H, s, Me).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta = 204.5$ (C=O); 112.4 (C); 67.5 (CH_2); 51.3 (OMe); 20.5 (Me).

2-Methoxy-2-methyl-5-tert.-butyldimethylsilyloxy-5-cyano-1,3-dioxan (21)



10 Zu einer Lösung des Ketons 20 (1.75 g, 12.0 mmol, 1 equiv) in DMF (13 ml) wird je eine Spatelspitze Kaliumcyanid und 18-Krone-6 gegeben und unter Argon auf 0°C gekühlt. Während 8 min wird tert.-Butyldimethylsilylcyanid (1.95 g, 13.8 mmol, 1.15 equiv) in DMF (3 ml) zugetropft. Nach 30 min wird mit Ether (200 ml) verdünnt, anschließend mit Wasser (2 × 200 ml) und mit gesättigter Kochsalz-Lösung (100 ml) gewaschen, schließlich die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird im Kugelrohrföfen (bei 150°C und 0.08 mbar) destilliert. Man erhält

15 das Diastereomerenmischungs 21a, b (2.90 g, 10.1 mmol, 84%) im Verhältnis 8 : 1 in Form eines klaren Öls. Für analytische Zwecke wird eine kleine Menge säulenchromatographisch (Hexan/Essigester 19 : 1) in die Diastereomere aufgetrennt.

$C_{13}H_{25}NO_4Si$ (287.43)

20 berechnet: C 54.32%; H 8.77%; N 4.87%;
gefunden: C 54.68%; H 8.57%; N 4.83%.

DC (Hexan/Essigester 9 : 1): 21a (Hauptisomer): 0.29, 21b (Nebenisomer): 0.35.

25 MS (Cl, NH_3):

288 (52, MH^+); 256 (100, $M^+ - OMe$); 230 (11, $M^+ - tBu$); 143 (10); 126 (14).

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$):

21a: δ = 3.84 (4H, s, CH_2); 3.30 (3H, s, OMe); 1.50 (3H, s, Me); 0.87 (9H, s, Si^tBu); 0.24 (6H, s, $SiMe_2$).

30 21b: δ = 3.84 (4H, s, CH_2); 3.31 (3H, s, OMe); 1.46 (3H, s, Me); 0.90 (9H, s, Si^tBu); 0.24 (6H, s, $SiMe_2$).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$):

21a: δ = 120.2 (CN); 111.5 (CO_3); 66.2 (CH_2); 63.6 (C); 51.0 (OMe); 25.4 ($SiCMe_3$); 21.2 (Me); 17.9 ($SiCMe_3$); -3.5 ($SiMe_2$).

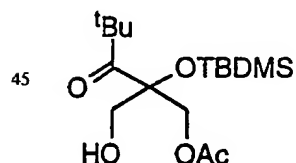
35 21b: δ = 118.8 (CN); 111.5 (CO_3); 66.2 (CH_2); 63.6 (C); 50.8 (OMe); 25.7 ($SiCMe_3$); 20.9 (Me); 17.9 ($SiCMe_3$); -3.8 ($SiMe_2$).

IR (NaCl):

2956, 2860 (C-H); 2237 (CN), 1263 (Si-Me); 1152 (C-O).

40

1-Acetoxy-2-tert.-butyldimethylsilyloxy-3-hydroxyl-2-pivaloyl-propan (22)



50 Das Nitrit 21 (2.60 g, 9.0 mmol, 1 equiv) wird mit Toluol koevaporiert, mit Kupfer(I)iodid (17.5 mg, 0.09 mmol, 0.01 equiv) versetzt und in abs. Ether (150 ml) unter Argon gelöst. Nach kurzer Behandlung im Ultraschallbad wird die Suspension auf -78°C gekühlt und langsam $tBuLi$ -Lösung (22.6 ml, 36 mmol, 1.6M in Pentan, 4 equiv) zugespritzt. Die olivgrüne Lösung wird während 3.5 h gerührt, dann mit wäßriger Essigsäure (30 ml, $HOAc/H_2O$ 1 : 1) rasch versetzt; nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird weitere wäßrige Essigsäure (100 ml, $HOAc/H_2O$ 2 : 1) zugegeben und über

55 Nacht kräftig gerührt. Die etherische Phase wird abgetrennt, die wäßrige Phase mit Ether extrahiert (2 × 50 ml), die vereinigten organischen Phasen getrocknet ($MgSO_4$) und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Essigsäure wird durch zweimalige Koevaporation mit Toluol entfernt. Nach Chromatographie (Hexan/Essigester 4 : 1) erhält man das Keton 22 (2.45 g, 7.4 mmol, 84%) als weißen Feststoff.

60 $C_{16}H_{32}O_5Si$ (332.52)

berechnet: C 57.79%; H 9.70%;
gefunden: C 57.77%; H 9.77%.

DC (Hexan/Essigester 4 : 1): 0.37.

65

Smp.: 61–62°C.

MS (FAB):

333 (17, MH⁺); 315(20); 275(8), 247(13); 171(16), 73(66); 57(100).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

d = 4.37 (1H, d, J = 11.7 Hz, CH₂H₅OAc); 4.22 (1H, d, J = 11.7 Hz, CH₂H₅OAc), 3.83 (1H, dd, J = 11.2, 9.2 Hz, CH₂H₅OH), 3.65 (1H, dd, J = 11.2, 3.6 Hz, CH₂H₅OH), 2.21 (1H, dd, J = 9.2, 3.6 Hz, OH); 2.05 (3H, s, Ac); 1.30 (9H, s, CO^tBu); 0.98 (9H, s, Si^tBu); 0.23 (3H, s, SiMe); 0.21 (3H, s, SiMe).

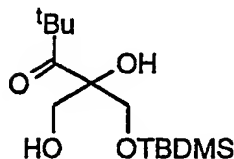
¹³O-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 217.5 (C=O), 170.3 (OC=O); 86.9 (C); 68.2 (CH₂OAc)*; 66.9 (CH₂OH)*, 45.1 (CMe₃); 26.3 (CMe₃); 26.0 (SiCMe₃); 20.8 (MeC=O); 18.7 (SiCMe₃); -2.2, -2.4 (SiMe₂).

IR (NaCl):

3518 (O-H); 2957, 2857 (C-H); 1748 (OC=O); 1698 (C=O); 1254 (Si-Me).

1-tert.-Butyldimethylsilyloxy-2,3-dihydroxy-2-pivaloyl-propan (23)



Das Acetat 22 (3.90 g, 11.7 mmol) wird in einem Methanol-Wasser-Gemisch (20 : 1, 25 ml) gelöst, mit Kaliumcarbonat (250 mg) versetzt und 5 h gerührt. Die Mischung wird durch Kieselgel filtriert, mit Essigester nachgewaschen und am Rotationsverdampfer eingengt. Man erhält den Silylether 23 (3.40 g, 11.7 mmol, 100%) als klare Flüssigkeit ohne weitere Reinigung.

C₁₄H₃₀O₄Si (290.48)

berechnet: C 57.89%; H 10.41%;

gefunden: C 57.70%; H 10.23%.

DC (Hexan/Essigester 4 : 1): 0.34.

MS (FAB):

291 (31, MH⁺); 233 (9); 205 (11), 159 (21), 73 (56), 57 (100).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ = 3.86 (1H, d, J = 9.8 Hz, CH₂H₅OTBDMS); 3.74 (1H, d, J = 9.8 Hz, CH₂H₅OTBDMS), 3.69 (1H, dd, J = 11.3, 8.0 Hz, CH₂H₅OH); 3.65 (1H, s, COH); 3.59 (1H, dd, J = 11.3, 5.3 Hz, CH₂H₅OH), 2.39 (1H, dd, J = 8.0, 5.3 Hz, CH₂OH); 1.26 (9H, s, CO^tBu), 0.88 (9H, s, Si^tBu); 0.07 (3H, s, SiMe); 0.06 (3H, s, SiMe).

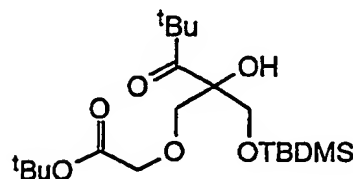
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ = 217.4 (C=O); 84.2 (C); 66.5 (CH₂OTBDMS)*; 65.8 (CH₂OH)*; 44.8 (CMe₃); 26.4 (CMe₃); 25.8 (SiCMe₃); 18.2 (SiCMe₃); -5.5, -5.6 (SiMe₂).

IR (NaCl):

3482 (O-H); 2956, 2930, 2858 (C-H); 1693 (C=O), 1256 (Si-Me).

5-Hydroxyl-5-pivaloyl-6-tert.-butyldimethylsilyloxy-3-oxa-hexansäure-tert.-butylester (24)



Der Alkohol 23 (2.8 g, 9.66 mmol, 1 equiv) wird in DMF (20 ml) gelöst, auf 0°C gekühlt und mit Silber(I)oxid (3.35 g, 14.5 mmol, 1.5 equiv) versetzt. Anschließend wird Bromessigsäuretert.-butylester (4.25 ml, 29 mmol, 3 equiv) zugespritzt und die Suspension unter langsamer Erwärmung auf Raumtemperatur unter Lichtausschluß 18 h gerührt. Die Mischung wird mit Ether (200 ml) verdünnt und mit Wasser (3 × 50 ml) gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und eingengt. Reinigung durch Säulenchromatographie (Hexan/Essigester 9 : 1) ergibt den Ester 24 (2.8 g, 6.9 mmol, 72%) als farbloses Öl.

C₂₀H₄₀O₆Si (404.63)

berechnet: C 59.37%; H 9.96%;

gefunden: C 59.21%; H 9.98%.

DC (Hexan/Essigester 9 : 1): 0.43.

5 MS (FAB):

405 (9, MH⁺); 341 (31); 291 (10), 263 (12); 129 (14); 73 (26); 57 (100).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

10 δ = 4.08 (1H, s, COH); 4.03 (1H, d, J = 16.7 Hz, C=OCH₂H_bO); 3.93 (1H, d, J = 16.7 Hz, C=OH₂H_bO); 3.87 (1H, d, J = 9.6 Hz, CCH₂H_bOCH₂); 3.85 (1H, d, J = 10.0 Hz, CH₂H_bOTBDMS); 3.63 (1H, d, J = 10.0 Hz, CH₂H_bOTBDMS); 3.53 (1H, d, J = 9.6 Hz, CCH₂H_bOCH₂); 1.48 (9H, s, O^tBu); 1.27 (9H, s, CO^tBu); 0.88 (9H, s, Si^tBu); 0.06 (3H, s, SiMe), 0.05 (3H, s, SiMe).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

15 δ = 216.9 (C=O); 170.0 (OC=O); 85.2 (C), 82.1 (OCMe₃); 75.4 (COCH₂O); 69.2 (CCH₂OCH₂); 66.9 (CH₂OTBDMS); 44.9 (CMe₃); 28.1 (OCMe₃); 26.6 (CMe₃); 25.9 (SiCMe₃); 18.3 (SiCMe₃), -5.4, -5.5 (SiMe₂).

IR (NaCl):

3440 (O-H); 2930 (C-H); 1732 (OC=O); 1694 (C=O); 1253 (Si-Me),

20

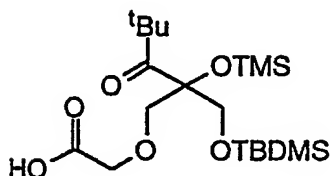
UV-VIS (THF):

300 (ϵ = 64, $n \rightarrow \pi^*$ C=O).

5-Hydroxyl-5-pivaloyl-6-tert.-butyldimethylsilyloxy-3-oxa-hexansäure (25)

25

30



35 Der Ester 24 (2.30 g, 5.68 mmol, 1 equiv) wird mit Toluol koevaporiert, in abs. THF (20 ml) gelöst und auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 2,6-Lutidin (1.98 ml, 17 mmol, 3 equiv) und Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester (TMSOTf, 2.57 ml, 11.4 mmol, 2 equiv) wird die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt, nach 1 h dann auf 40°C. Nach weiteren 2 h bei 40°C wird weiteres 2,6-Lutidin (1.32 ml, 11.4 mmol, 2 equiv) und TMSOTf (1.54 ml, 8.5 mmol, 1.5 equiv) zugespritzt. Nach 1 h wird die Reaktion durch Zugabe von wäßriger Essigsäure (20 ml, HOAc/H₂O 1 : 2) beendet und mit Ether (200 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter Kochsalz-Lösung (50 ml) gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach Säulenchromatographie (Hexan/Essigester 1 : 1 mit 1% HOAc) erhält man die Säure 25 (2.29 g, 5.45 mmol, 96%) als fast farblose Kristalle.

C₁₉H₄₀O₆Si₂ (420.70)

berechnet: C 54.25%; H 9.58%

45 gefunden: C 54.42%; H 9.57%.

DC (Hexan/Essigester 1 : 1 mit 1% HOAc): 0.50.

Smp.: 84–86°C.

50

MS (FAB):

421 (19, MH⁺); 405 (4); 363 (5); 335 (3); 259 (17); 231 (13); 147 (18); 73 (100); 57 (88).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

55 δ = 4.06 (2H, s, COCH₂O); 3.89 (1H, d, J = 9.3 Hz, CCH₂H_bOCH₂); 3.79 (1H, d, J = 10.4 Hz, CH₂H_bOTBDMS); 3.73 (1H, d, J = 10.4 Hz, CH₂H_bOTBDMS); 3.61 (1H, d, J = 9.3 Hz, CCH₂H_bOCH₂); 1.25 (9H, s, CO^tBu); 0.89 (9H, s, Si^tBu); 0.24 (9H, s, TMS); 0.07 (3H, s, SiMe); 0.05 (3H, s, SiMe).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

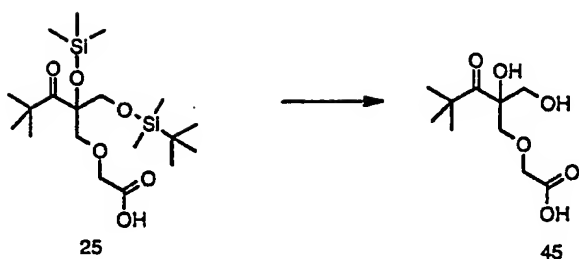
60 δ = 216.7 (C=O); 172.2 (OC=O); 88.6 (C); 75.6 (COCH₂O); 68.4 (CCH₂OCH₂); 67.4 (CH₂OTBDMS); 45.1 (CMe₃); 26.7 (CMe₃); 25.9 (SiCMe₃); 18.5 (SiCMe₃); 2.1 (TMS), -5.5 (SiMe₂).

IR (NaCl):

3100 (COO-H); 2957, 2859 (C-H); 1732 (HOC=O); 1698 (C=O); 1250 (Si-Me).

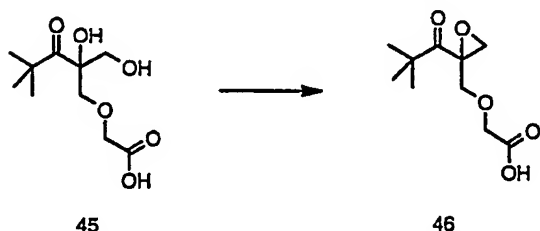
65

Abspaltung der Silyschutzgruppen



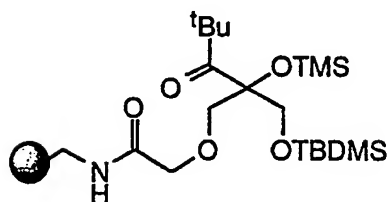
Die Säure 25 (0.1 g, 0.237 mmol) wird in THF (1 ml) aufgelöst und mit $(\text{HF})_3 \cdot \text{Et}_3\text{N}$ (1 ml) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird eingedunstet und der Rückstand mit Methylchlorid (10 ml) verdünnt und mit gesättigter Kochsalz-Lösung (10 ml) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das Diol 45 wurde als Rohprodukt weiterverwendet.

Umwandlung der Dirole in die Oxirane



Das Diol 45 (100 mg, 0.427 mmol) wird in Pyridin (2 ml) aufgenommen und unter Argon bei Raumtemperatur mit 120 mg Tosyl-Chlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wird während 48 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Nach Einengen des Reaktionsproduktes am Hochvakuum wird der Rückstand in Methylchlorid aufgelöst und mit wässriger Salzsäure (0.1 M) gewaschen. Nach zweimaligem Waschen mit gesättigter Kochsalzlösung und Nachextraktion mit Methylchlorid wird die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Säulenchromatographie (Hexan/Essigester 1 : 2 mit 1% Essigsäure) erhält man das Säure-Epoxid 46 als farblosen Rückstand.

Pivaloyl-Linker (silyliert) derivatisiertes Harz (26)



TentaGel S NH_2 Harz (1.0 g, 0.29 mmol/g, 0.29 mmol, Novabiochem, in einem anderen Ansatz wird TentaGel S NH_2 , 028 mmol/g, von Rapp Polymere eingesetzt) wird in abs. Methylchlorid (5 ml) suspendiert, mit dem Linker 25 (183 mg, 0.435 mmol, 1.5 equiv), DMAP (9 mg, 0.07 mmol, 0.25 equiv), DIC (112 μl , 0.73 mmol, 2.5 equiv) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit Methylchlorid (3 \times), DMF (3 \times), Methylchlorid (3 \times) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Man erhält 1.10 g des Pivaloyl-Linker-Harzes 26. Der Kaiser-Test auf freie Aminogruppen am Harz fällt negativ aus. Bei positivem Ausgang ist ein Blockieren der restlichen freien Aminogruppen durch Behandlung mit Acetanhydrid (Ac_2O /Pyridin 1 : 3, 15 min) möglich. Anschließend findet auch hier der oben beschriebene Waschvorgang statt.

TentaGel S $\text{NH} \cdot \text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{Si}_2$

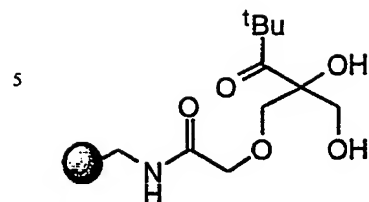
^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

δ = 216.4 (C=O); 169.2 (NHC=O); 89.0 (C); 75.4 (COCH_2O); 69.7 (CCH_2OCH_2); 67.8 (CH_2OTBDMS); 45.1 (CMe_3); 38.8 (CH_2NH); 26.8* (SiCMe_3); 26.1* (CMe_3); 18.6 (SiCMe_3); 2.3 (TMS); -5.3, -5.4 (SiMe_2).

IR (KBr):

2869 (C-H); 1721 (C=O); 1452; 1251; 1103.

Pivaloyl-Linker (desilyliert) derivatisiertes Harz (27)



Harz 26 (1.10 g, max. 0.29 mmol) wird in THF (4 ml) suspendiert und mit $(\text{HF})_3 \cdot \text{Et}_3\text{N}$ (1 ml) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Waschen mit THF (2x), Methylenchlorid (4x) und Trocknen am Hochvakuum erhält man 1.01 g des fertigen Pivaloyl-Linker-Harzes 27.

15 TentaGel S NH $\cdot \text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_5$
gefunden: C 63.68%; H 8.81%; N 0.40%; O 27.26%;

zum Vergleich: TentaGel S NH_2 (0.29 mmol/g)
gefunden: C 64.25%; H 8.91%; N 0.40%; O 26.31%.

20 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):
 δ = 216.5 (C=O); 170.1 (NHC=O); 84.8 (C), 76.1 (COCH_2O), 69.8 (CCH_2OCH_2), 65.7 (CH_2OH); 45.0 (CMe_3); 38.8 (CH_2NH); 25.6 (CMe_3).

25 IR (KBr):
3350 (O-H); 2970 (C-H); 1762; 1701 (C=O); 1522; 1450; 1253; 1187.

Pivaloyl-Linker-Harz mit zwei bzw. einer Trimethylsilylschutzgruppe

30 Harz 27 (200 mg, max. 0.058 mmol, 1 equiv) wird in THF (2 ml) suspendiert, auf 0°C gekühlt, mit 2,6-Lutidin (40 ml, 0.35 mmol, 6 equiv) und Trifluormethansulfonsäuretrimethylsylester (TMSOTf, 52 ml, 0.29 mmol, 5 equiv) versetzt und langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt. Nach 3 h wird nochmals die gleiche Menge 2,6-Lutidin und TMSOTf zugesetzt und für 1 h auf 40°C erwärmt. Anschliessend wird mit MeOH (2x), Methylenchlorid (3x) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Man erhält 208 mg Harz 183a (zweifach trimethylsilylgeschützt).

35 TentaGel S NH. $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}_5\text{Si}_2$

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 216.7 (C=O); 169.3 (NHC=O); 88.9 (C); 75.3 (COCH_2O); 69.7 (CCH_2OCH_2); 66.7 (CH_2OTMS); 45.1 (CMe_3); 38.7 (CH_2NH); 26.7 (CMe_3); 2.4 (OSiMe_3); -0.6 ($\text{CH}_2\text{OSiMe}_3$).

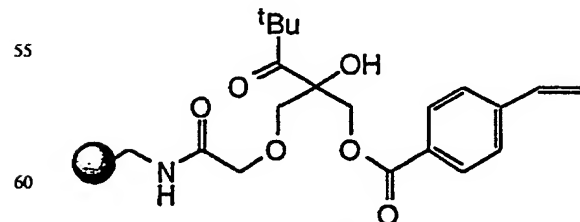
40 Photolinker(TMS)-TentaGel (183)

Doppelt silyliertes Harz 183a (208 mg, max. 0.058 mmol) wird in 5% methanolischer Citronensäure-Lösung suspendiert und 4 h bei RT gerührt. Nach Waschen mit MeOH (2x), Methylenchlorid (3x) und Trocknen am Hochvakuum werden 202 mg des an der tertiären Hydroxygruppe monosilylierten Harzes 183 erhalten.

TentaGel S NH $\cdot \text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{Si}$

50 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 217.3 (C=O); 169.3 (NHC=O); 87.2 (C); 74.6 (COCH_2O); 69.6 (CCH_2OCH_2); 66.0 (CH_2OH); 45.3 (CMe_3); 38.9 (CH_2NH); 26.7 (CMe_3); 2.3 (TMS).

Pivaloyl-Linker-Harz mit 4-Vinylbenzoesäure (33)



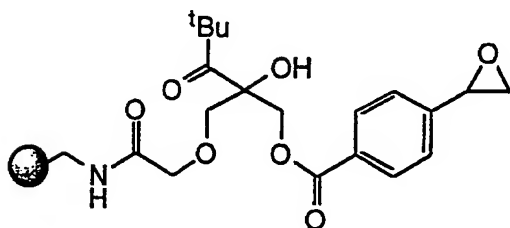
65 Pivaloyl-Linker-Harz 27 (200 mg, max. 0.058 mmol, 1 equiv) wird in abs. Methylenchlorid (2 ml) suspendiert, mit 4-Vinylbenzoesäure (17 mg, 0.116 mmol, 2 equiv), DMAP (1.4 mg, 0.12 mmol, 0.2 equiv) und zuletzt mit DIC (11 μl , 0.07 mmol, 1.2 equiv) versetzt. Es wird 6 h bei Raumtemperatur geschüttelt, mit Methylenchlorid (5x) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet; dies ergibt 206 mg Harz 33.

TentaGel S NH $\cdot \text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_6$

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

δ = 215.1 (C=O); 169.7 (NHC=O); 166.2 (OC=O); 142.4, 130.1, 126.3, 126.2 (Ar-C); 136.0 ($\text{CH}_2=\text{CH}$); 117.0 ($\text{CH}_2=\text{CH}$); 83.9 (C); 75.6 (COCH_2O); 69.8 (CCH_2OCH_2); 68.0 ($\text{CH}_2\text{OC=O}$); 45.3 (CMe_3); 38.9 (CH_2NH); 26.8 (CMe_3).

Pivaloyl-Linker-Harz mit 4-Oxiranylbenzoesäure (38)



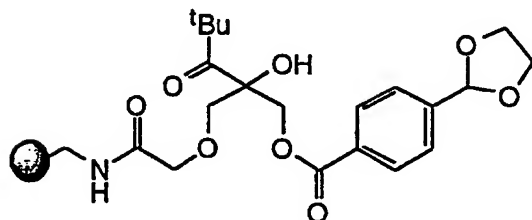
4-Vinylbenzoesäure-beladenes Harz 33 (100 mg, max. 0.029 mmol, 1 equiv) wird in Methylenchlorid (1 ml) suspendiert, mit meta-Chlorperbenzoesäure (55%, 31 mg, 0.1 mmol, 3.3 equiv) versetzt und 24 h geschüttelt. Nach Waschen mit Methylenchlorid (3 \times), THF (3 \times), Methylenchlorid (3 \times) und Trocknen am Hochvakuum erhält man 101 mg des weißen Harzes 38.

TentaGel S NH \cdot $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_7$

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

δ = 215.0 (C=O); 169.7 (NHC=O); 166.1 (OC=O); 143.6, 130, 129.4, 125.6 (Ar-C); 83.6 (C); 75.6 (COCH_2O); 69.8 (CCH_2OCH_2); 68.0 ($\text{CH}_2\text{OC=O}$); 51.8* (CHCH_2); 51.5* (CHCH_2); 45.2 (CMe_3); 38.9 (CH_2NH); 26.8 (CMe_3).

Pivaloyl-Linker-Harz mit 4-(1,3-Dioxolan-2-yl)-benzoesäure (30)



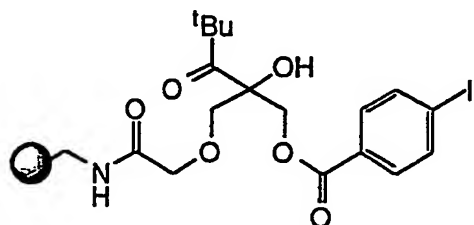
Pivaloyl-Linker-Harz 27 (200 mg, max. 0.058 mmol, 1 equiv) wird in abs. THF (1 ml) suspendiert, mit 4-(1,3-Dioxolan-2-yl)-benzoesäure (23 mg, 0.116 mmol, 2 equiv), DMAP (1.4 mg, 0.012 mmol, 0.2 equiv) und zuletzt mit DIC (11 μl , 0.07 mmol, 2 equiv) versetzt und 16 h geschüttelt. Nach Waschen mit THF (3 \times), Methylenchlorid (3 \times) und Trocknen am Hochvakuum erhält man 207 mg Harz 30.

TentaGel S NH \cdot $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_8$

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

δ = 215.0 (C=O); 169.7 (NHC=O); 166.2 (OC=O); 143.4, 130.2, 129.8, 126.6 (Ar-C); 102.9 (OCHO); 83.6 (C); 75.6 (COCH_2O); 69.7 (CCH_2OCH_2); 68.1 ($\text{CH}_2\text{OC=O}$); 65.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 45.3 (CMe_3); 38.9 (CH_2NH); 26.8 (CMe_3).

Pivaloyl-Linker-Harz mit 4-Iodbenzoesäure (34)



Pivaloyl-Linker-Harz 27 (300 mg, max. 0.087 mmol, 1 equiv) wird in THF (3 ml) suspendiert, mit 4-Iodbenzoesäure (43 mg, 0.174 mmol, 2 equiv), DMAP (2.2 mg, 0.017 mmol, 0.2 equiv), DIC (17.5 μl , 0.113 mmol, 1.3 equiv) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit THF (2 \times) und Methylenchlorid (5 \times) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Man erhält 308 mg des Harzes 34.

TentaGel S NH \cdot $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{IO}_6$

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

δ = 215.1 (C=O), 169.7 (NHC=O); 165.9 (OC=O); 137.8, 131.2, 129.2, 101.2 (Ar-C); 83.4 (C); 75.5 (COCH₂O); 69.7 (CCH₂OCH₂); 68.1 (CH₂OCO); 45.3 (CMe₃); 38.9 (CH₂NH), 26.7 (CMe₃).

Stille-Reaktion mit Harz 34

5

Harz 34 wird in NMP (1 ml) suspendiert und 10 min mit Argon begast. Anschließend wird Tris(dibenzylidenacetone)dipalladium-Chloroform-Komplex (Pd₂dba₃ · CHCl₃, 3.1 mg, 0.003 mmol, 0.1 equiv), Triphenylarsin (AsPh₃, 3.7 mg, 0.012 mmol, 0.4 equiv) und nach 5 min Tributylzinnhydrid (Bu₃SnH, 20 μ l, 0.058 mmol, 2 equiv) zugegeben. Nach 6 h bei 50 °C (mit gelegentlichem Schütteln) wird nochmals Pd₂dba₃ · CHCl₃ (1.5 mg, 0.0015 mmol, 0.05 equiv), AsPh₃ (1.8 mg, 0.006 mmol, 0.2 equiv) und Bu₃SnH (10 μ l, 0.029 mmol, 1 equiv) zugegeben. Nach weiteren 36 h wird das Harz mit NMP (2 \times), THF (2 \times) und Methylenchlorid (2 \times) gewaschen und dabei im Ultraschallbad behandelt. Nach Trocknen am Hochvakuum erhält man 102 mg eines tiefbraunen Harzes 31.

Charakterisierung: siehe unten

15

Suzuki-Reaktion mit Harz 34

Harz 34 (100 mg, max. 0.028 mmol, 1 equiv) wird in DMF suspendiert, mit Argon 10 min begast, mit Phenylboronsäure (PhB(OH)₂, 14 mg, 0.112 mmol, 4 equiv), Dichloro[1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II) (PdCl₂dppf, 4 mg, 0.006 mmol, 0.2 equiv), Triethylamin (39 μ l, 0.28 mmol, 10 equiv) versetzt und 18 h auf 65 °C mit gelegentlichem Schütteln erwärmt. Nach dem Waschen und der Behandlung im Ultraschallbad mit DMF (3 \times), Methylenchlorid (3 \times) und dem Trocknen am Hochvakuum erhält man 101 mg eines braunen Harzes 31.

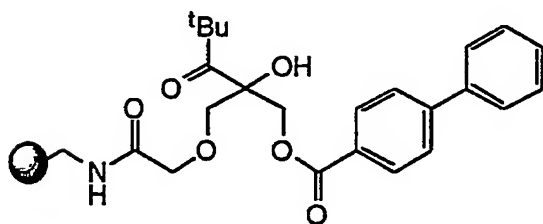
Charakterisierung: siehe unten

25

Pivaloyl-Linker-Harz mit Biphenyl-4-carbonsäure (31)

30

35



Pivaloyl-Linker-Harz 27 (400 mg, max. 0.116 mmol, 1 equiv) wird in THF (4 ml) suspendiert, mit Biphenyl-4-carbonsäure (46 mg, 0.232 mmol, 2 equiv), DMAP (2.8 mg, 0.023 mmol, 0.2 equiv), DIC (23 μ l, 0.15 mmol, 1.3 equiv) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit THF (2 \times) und Methylenchlorid (5 \times) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Man erhält 418 mg des Harzes 31.

40

TentaGel S NH · C₂₃H₂₅O₆

gefunden: C 64.23%; H 8.68%; N 0.40%; O 26.71%.

45

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

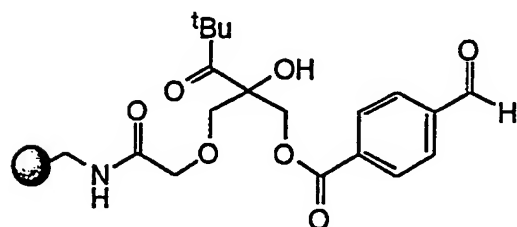
δ = 215.1 (C=O), 169.7 (NHC=O); 166.4 (OC=O); 146.0, 139.8, 130.3, 129.1, 128.4, 127.3, 127.2 (Ar-C); 83.6 (C); 75.6 (COCH₂O); 69.7 (CCH₂OCH₂); 68.0 (CH₂OCO); 45.3 (CMe₃); 38.9 (CH₂NH), 26.8 (CMe₃).

50

Pivaloyl-Linker-Harz mit 4-Formylbenzoesäure (32)

55

60



Pivaloyl-Linker-Harz 27 (300 mg, max. 0.084 mmol, 1 equiv) wird in Methylenchlorid (3 ml) suspendiert, mit 4-Formylbenzoesäure (25 mg, 0.168 mmol, 2 equiv), DMAP (2.2 mg, 0.017 mmol, 0.2 equiv), DIC (19.5 μ l, 0.126 mmol, 1.5 equiv) versetzt und 2 d bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird mit Methylenchlorid (3 \times), DMF (3), Methylenchlorid (3 \times) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Man erhält 307 mg des Harzes 32.

65

TentaGel S NH · C₁₈H₂₁O₇

gefunden: C 65.01%; H 8.63%; N 0.41%; O 25.92%.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):

δ = 215.1 (C=O); 191.6 (HC=O); 169.7 (NHC=O); 165.3 (OC=O); 139.4, 134.7, 130.3, 129.6 (Ar-C); 83.3 (C); 75.6 (COCH₂O); 69.8 (CCH₂OCH₂); 68.3 (CH₂OCO); 45.3 (CMe₃); 38.9 (CH₂NH), 26.7 (CMe₃).

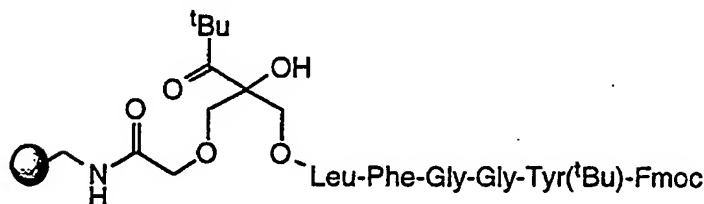
5

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

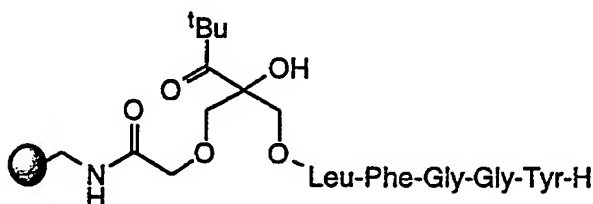
δ = 214.8 (C=O); 169.8 (NHC=O); 166.4 (OC=O); 129.7, 128.2, 126.5, 126.1 (Ar-C); 83.6 (C); 75.5 (COCH₂O); 74.8 (CHOH); 69.6 (CCH₂OCH₂); 67.9 (CH₂OCO); 45.2 (CMe₃); 38.9 (CH₂NH); 32.1 (CH₂CH₃); 26.8 (CMe₃); 10.1 (CH₃).

Pivaloyl-Linker-Harz mit geschütztem Leu-Enkephalin (36) und entschütztem Leu-Enkephalin (37)

10



15



20

25

Beladung mit der ersten Aminosäure Fmoc-Leucin

30

Die Beladung des Pivaloyl-Linker-Harzes 27 (200 mg, max. 0.058 mmol, 1 equiv) mit Fmoc-Leucin (205 mg, 0.58 mmol, 10 equiv) erfolgt analog der oben beschriebenen Beladung mit Fmoc-Glycin. Für die Aktivierung des Fmoc-Leucins mit DIC (46 μl , 0.29 mmol, 5 equiv) genügt Methylenchlorid (6 ml) allein als Lösungsmittel. Für die Kupplung des aktivierten Fmoc-Leucins an das Harz wird wiederum DMAP (7 mg, 0.058 mmol, 1 equiv) eingesetzt. Die Beladung beträgt 0.191 mmol/g (68%).

35

Synthese des Peptids Leu-Enkephalin am Pivaloyl-Linker-Harz 29

Alle folgenden Reaktionsschritte werden in einem Gefäß für die manuelle Peptidsynthese an fester Phase durchgeführt. Mit Hilfe dieses Gefäßes kann abwechselnd mit Argon die Reaktionslösung durchmischt werden und Reagenzlösungen, sowie Waschlösungen entfernt werden. Folgende Reagenzien werden eingesetzt:

40

Harz 29 (200 mg, 0.038 mmol, 1 equiv)

1H-Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP, 0.5 M in DMF, je 190 μl , 0.095 mmol, 2.5 equiv)

45

Diisopropylethylamin (DIPEA, je 33 μl , 0.19 mmol, 5 equiv)

Fmoc-Phe-OH (37 mg, 0.095 mmol, 2.5 equiv)

Fmoc-Gly-OH (je 28 mg, 0.095 mmol, 2.5 equiv)

Fmoc-Tyr(tBu)-OH (44 mg, 0.095 mmol, 2.5 equiv).

50

Das Peptid wird an dem Harz 29 gemäß dem unten beschriebenen Synthesesyklus synthetisiert.

Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF (2 ml) wird zu dem Harz gegeben und die Suspension während 7 min durchmischt. Die Reaktionslösung wird abgesaugt und mit DMF (3 \times) gewaschen. Der Kaiser-Test zeigt in allen Fällen positives Ergebnis.

Kupplung: Zu dem Fmoc-entschützten Harz wird DMF (1 ml) und die jeweilige Aminosäure (AS) gegeben. Nach dem Lösen der AS erfolgt Zugabe der PyBOP-Lösung und des DIPEA und die erhaltene Suspension wird durchmischt. Nach 30 min werden die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz gewaschen (3 \times DMF, 3 \times Methylenchlorid, 3 \times DMF). Der Kaiser-Test zeigt in allen Fällen ein negatives Ergebnis an.

55

Nach der Kupplung mit Fmoc-Tyr(tBu)-OH wird das Harz mit DMF (3 \times) und THF (3 \times) gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Man erhält das Pivaloyl-Linker Harz mit geschütztem Leu-Enkephalin (36) (240 mg, 0.147 mmol/g). Vollständige Entschützung erfolgt durch Behandlung mit 20% Piperidin in DMF (2 ml, 7 min), Waschen mit DMF (3 \times), THF (3 \times) und Behandlung mit Trifluoressigsäure/Wasser/Triethylsilan (95 : 2.5 : 2.5, 2 ml, 90 min). Man erhält das Pivaloyl-Linker-Harz mit entschütztem Leu-Enkephalin (37) (230 mg) nach Waschen mit THF (5 \times) und Trocknen am Hochvakuum.

60

65

Allgemeine Photolysebedingungen

In der Quarzglasküvette: Das Harz (2–8 mg) wird in einer mit einem Rührfisch versehenen Quarzglasküvette in Lö-

sungsmittel (3 ml) suspendiert. Die Photolyse wird durch Bestrahlung der Probe mit einer 500 W-Hg-Lampe und einem vorgeschalteten Kantenfilter (meist > 320 nm) durchgeführt. Die Lichtintensität beträgt bei fokussiertem Strahl 1000 mW/cm² (gemessen zwischen 300 und 400 nm). Durch Defokussierung des Lichtstrahls kann die Intensität für bestimmte Experimente auf 50 mW/cm² verringert werden. Die Proben werden von der Seite bestrahlt und währenddessen mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt. Der Fortgang der Photolyse wird UV-spektroskopisch verfolgt. Im Fall der Aminosäuren und Peptide wird die Ausbeute UV-spektroskopisch unter Verwendung einer Eichkurve mit Standards authentischen Materials bestimmt. Im Fall der aromatischen Carbonsäuren wird die überstehende Lösung mit RP-HPLC analysiert. Für eine quantitative Bestimmung wird zur Photolyselösung eine definierte Menge (meist 1 µmol) einer Standardlösung von Benzoesäure zugegeben, ein Teil entnommen, lyophilisiert, in MeCN/H₂O (9 : 1) aufgenommen und mittels RP-HPLC untersucht. Die Menge an Photolyseprodukt wird nach Peakintegration und Kenntnis der Flächenfaktoren berechnet. Die Charakterisierung der Photolyseprodukte erfolgt durch Koelution mit authentischem Material. Im Fall des geschützten und entschützten Leu-Enkephalins erfolgt zusätzliche Charakterisierung durch MALDI-TOF Massenspektrometrie.

In der Mikrotiterplatte: Harz (2–8 mg) wird in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und mit Lösungsmittel (0.2 ml) überschichtet. Photolysen werden mit einer 500 W-Hg-Lampe, die mit einem 280–400 nm dichroitischen Spiegel und einem 320 nm Kantenfilter versehen ist, durchgeführt. Jeweils 9 Vertiefungen können gleichzeitig von oben bestrahlt werden. Die quantitative Bestimmung der Photolyseprodukte erfolgt wie oben beschrieben durch Zugabe eines Standards und mittels RP-HPLC.

Ergebnistabelle 1

Aminosäuren und Peptide

Harz	28 (Fmoc-Gly)	29 (Fmoc-Leu)	45(Fmoc-Ala-Gly)	36(Fmoc-tBu-Enkephalin)	37 (Enkephalin)
Beladung	0.183 mmol/g	0.191 mmol/g	0.164 mmol/g	0.147 mmol/g	-
Einwaage	4.88 mg (3.15 mg)	2.68 mg	4.48 mg	3.02 mg	4.83 mg
Ausbeute	92% (84%)	89%	92%	88%	85%
Reinheit (RP-HPLC)	90% (92%) (290 nm)	96% (290 nm)	91% (290 nm)	86% (220 nm)	93% (220 nm)
Photolyse-Bedingungen	335 nm, 2 h, 25°C	320 nm, 15 min, 25°C	335 nm, 2h, 25°C	320 nm, 15 min, 25°C	320 nm, 15 min, 25°C
Photolyse-LM	THF (CH ₂ Cl ₂)	THF	THF	THF	THF/H ₂ O (9:1)
RP-HPLC-Bedingungen	30 - 100% MeCN in 30'	30 -100% MeCN in 30'	30 - 100% MeCN in 30'	30-100% MeCN in 30'	10-50% MeCN in 30'
Retentionszeit	10.6 min	17.0 min	9.1 min	19.2 min	17.5 min
MALDI-TOF	-	-	-	857(MNa ⁺); 873(MK ⁺) 895 (MNa ⁺ +K ⁺ -1)	557 (MH ⁺); 579 (MNa ⁺); 595 (MK ⁺)

Ergebnistabelle 2

Biphenylcarbonsäuren

Harz	31 (Biphenyl)	31 (Stille-Kupplung)	31 (Suzuki-Kupplung)
Einwaage	7.52 mg	4.60 mg	4.15 mg
Ausbeute (mit internem Standard)	71%	50%	72%
Reinheit (RP-HPLC)	95% (220 nm)	93% (220 nm)	93% (220 nm)
Photolyse-Bedingungen	320 nm, 15 min, 25°C, THF	320 nm, 15 min, 25°C, THF	320 nm, 10 min, 25°C, THF
HPLC-Bedingungen	30 - 100% MeCN in 30'	30 - 100% MeCN in 30'	30 - 100% MeCN in 30'
Retentionszeit	13.0 min	13.0 min	13.0 min

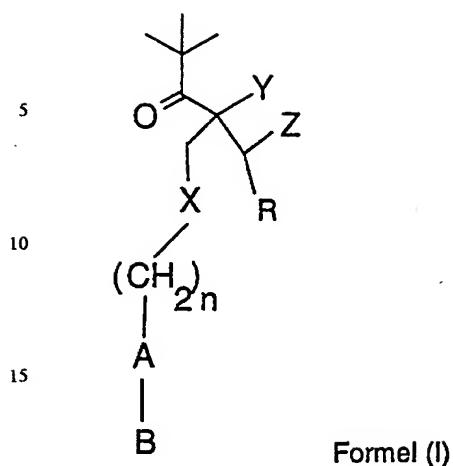
Ergebnistabelle 3

andere aromatische Carbonsäuren

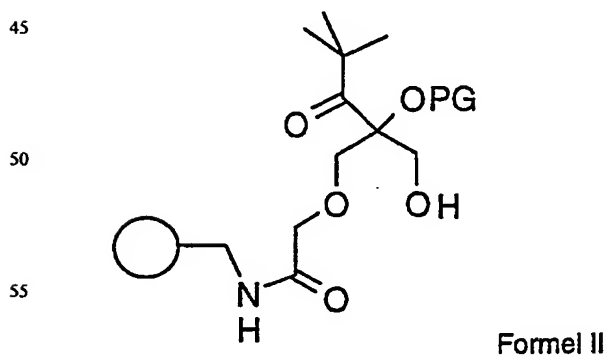
Harz	38 (Epoxid)	30 (Acetal)	41 (Kat. 40)	41 (Kat. 39)
Einwaage	4.86 mg	4.97 mg	6.08 mg	4.61 mg
Ausbeute (mit internem Standard)	65%	74%	35%	30%
Reinheit (RP-HPLC)	85% (220 nm)	93% (220 nm)	90% (230 nm)	94% (230 nm)
Photolyse-Bedingungen	320 nm, 15 min, 25°C, THF	320 nm, 90 min, 25°C, THF	320 nm, 15 min, 25°C, THF	320 nm, 12 min, 25°C, THF
RP-HPLC-Bedingungen	20 - 50% MeCN in 30'	20 - 50% MeCN in 30'	20 - 100% MeCN in 30'	20 - 100% MeCN in 30'
Retentionszeit	8.5 min	8.7 min	7.0 min	7.0 min
ee (chirales GC)	-	-	30%	6%

Patentansprüche

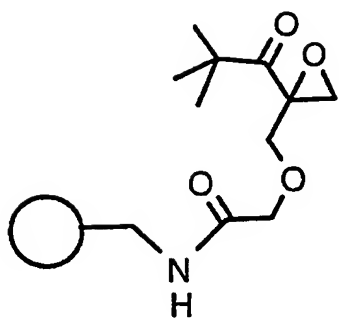
1. Verbindungen der allgemeinen Formel (I)



- 20 worin bedeuten
 A CH₂, Phenylen
 B COOH, CH₂OH, CH₂NH₂
 R Wasserstoff, (C₁-C₆)-Alkyl
 X Sauerstoff, CH₂
 25 Y, Z jeweils OH oder zusammen einen Oxiranring
 n null, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6.
 2. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) nach Anspruch 1, worin bedeuten
 A CH₂
 B COOH, CH₂OH, CH₂NH₂
 30 R Wasserstoff, Methyl
 X Sauerstoff, CH₂
 Y, Z jeweils OH oder zusammen einen Oxiranring
 n null.
 3. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) nach Anspruch 1, worin bedeuten
 35 A CH₂
 B COOH
 R Wasserstoff
 X Sauerstoff, CH₂
 Y, Z jeweils OH oder zusammen einen Oxiranring
 40 n null.
 4. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie über die funktionelle Gruppe B an ein Harz gebunden sind.
 5. Verbindungen der Formel (II)

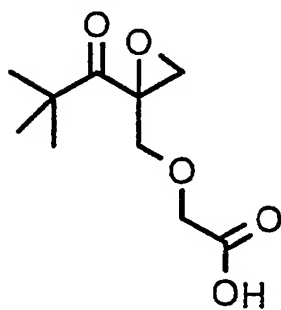


- 60 worin PG eine Schutzgruppe der Alkoholfunktion, insbesondere Trimethylsilyl bedeutet und das Kreissymbol das Harz darstellt.
 6. Verbindungen der Formeln (III)



Formel (III)

7. Verbindung der Formel (IV)



Formel (IV)

8. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 1 bis 3 und 7, als Linker in der Festphasensynthese.

9. Verwendung der Verbindungen nach Anspruch 1 bis 7, für Synthesen der kombinatorischen Chemie.

- Leerseite -